

MÔNICA MAZZEI FLORECKI

**PADRONIZAÇÃO DA FIXAÇÃO E DA MARCAÇÃO  
IMUNOCITOQUÍMICA DE CADERINAS EM OVÁRIO DE FÊMEAS  
JOVENS DE *Loxosceles intermedia* POSSIBILITANDO UMA ANÁLISE  
ULTRAESTRUTURAL**

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia  
Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do  
grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cloris Ditzel Faraco

CURITIBA  
2003

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>iv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 A ESPÉCIE <i>Loxosceles intermedia</i> .....	1
1.2 OVOGÊNESE NA <i>Loxosceles intermedia</i> .....	2
1.3 INFLUÊNCIA DA CADERINA NA OVOGÊNESE .....	6
1.4 PROCESSAMENTO DOS OVÁRIOS DE FÊMEAS JOVENS DE <i>Loxosceles intermedia</i> .	6
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
3.1 PADRONIZAÇÃO DA FIXAÇÃO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	10
3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO PARA DETECÇÃO DA PRESENÇA DE CADERINAS .....	10
<b>4. RESULTADOS E DISSCUSSÃO .....</b>	<b>12</b>
4.1 PADRONIZAÇÃO DA FIXAÇÃO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	12
4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO PARA DETECÇÃO DA PRESENÇA DE CADERINAS.....	14
<b>5. FIGURAS .....</b>	<b>16</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>28</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>29</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> <i>Loxosceles intermedia</i> .....	1
<b>FIGURA 2:</b> OVÁRIO DE <i>Loxosceles intermedia</i> .....	2
<b>FIGURA 3:</b> OVÓCITOS PEDUNCULADOS .....	3
<b>FIGURA 4:</b> CICATRIZES FORMADAS APÓS A LIBERAÇÃO DOS OVÓCITOS.....	5
<b>FIGURA 5:</b> CÉLULAS DA PAREDE DO OVÁRIO .....	17
<b>FIGURA 6:</b> MITOCÔNDRIAS .....	18
<b>FIGURA 7:</b> CORTE MAL DISTENDIDO.....	19
<b>FIGURA 8:</b> MITOCÔNDRIAS .....	20
<b>FIGURA 9:</b> MITOCÔNDRIAS E INTERDIGITAÇÕES .....	21
<b>FIGURA 10:</b> INTERDIGITAÇÕES .....	22
<b>FIGURA 11:</b> COMPLEXO DE GOLGI .....	23
<b>FIGURA 12:</b> NÚCLEO MAL PRESERVADO .....	24
<b>FIGURA 13 :</b> POSSÍVEL IMUNOMARCAÇÃO NO HEPATOPÂNCREAS .....	25
<b>FIGURA 14:</b> CÉLULAS DA PAREDE DO OVÁRIO MAL PRESERVADAS .....	26
<b>FIGURA 15:</b> OVÓCITO EM INÍCIO DE DIFERENCIAÇÃO MAL PRESERVADO .....	27

## RESUMO

A aranha conhecida popularmente como aranha marrom é, atualmente, responsável por um elevado índice de acidentes na cidade de Curitiba e região metropolitana. Tal situação aponta a necessidade de estudos a respeito da espécie, incluindo seu desenvolvimento com vistas a estratégias de controle populacional da mesma. O aparelho reprodutor feminino de *Loxosceles intermedia* apresenta ventralmente um par de ovários cujos ovidutos se unem para formar o útero (Morishita, 2003), o qual desemboca na abertura genital. Ao útero conectam-se um par de espermatecas. Os ovócitos estão localizados na parede ventral do ovário e aí começam seu processo de diferenciação em que o ovócito se distingue inicialmente por apresentar núcleo e volume citoplasmático maior em relação às células epiteliais ao seu redor. Enquanto os ovócitos amadurecem começam a aumentar de tamanho, o citoplasma de basófilo passa a ser eosinófilo e um pedúnculo de células epiteliais se forma, conectando os ovócitos à parede do ovário. Para estudos ao microscópio eletrônico de transmissão, foi realizada uma padronização do processamento do material para uma eficiente preservação do mesmo. A padronização foi obtida através da análise e da comparação dos resultados de quatro experimentos com soluções fixadoras e tamponantes com diferentes osmolaridades, implicando em diferentes níveis de penetração das soluções no ovário e consequentemente, diferentes níveis de preservação do mesmo. Os melhores resultados foram obtidos com solução fixadora composta por paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2%, cacodilato de sódio 0,1M e NaCl 0,2M, sendo a fixação em geladeira por 3 horas. Tal fixação permitiu a observação de interdigitações e organelas como mitocôndrias e complexo de Golgi das células ovarianas e foi repetida em experimentos imunocitoquímicos na tentativa de se conseguir marcação de moléculas clássicas de adesão ao microscópio eletrônico de transmissão, porém, nenhum resultado foi obtido. Nenhuma marcação foi observada possivelmente devido à má preservação das membranas celulares como consequência do longo período de tempo decorrido até ser realizada a fixação com o glutaraldeído, a fim de se evitar alterações nas moléculas de adesão. Em futuros experimentos imunocitoquímicos será necessário estabelecer o momento certo para se realizar a fixação com glutaraldeído e a concentração própria do mesmo de maneira a se conseguir obter uma boa preservação do ovário de *Loxosceles intermedia*.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Loxosceles intermedia*

A aranha *Loxosceles intermedia*, conhecida popularmente como aranha marrom, pertence à ordem Araneae cujas principais características são a presença de órgãos fiadores no abdome, quelíceras com glândulas de veneno e quatro pares de patas segmentadas (RUPPERT; BARNES, 1996) (Figura 1).

Figura 1: Fotografia de *Loxosceles intermedia*. O abdome ovalado (cabeça de seta) e a ausência de bulbos copulatórios nos pedipalpos (seta) caracterizam o espécimen como fêmea. (Fonte: laboratório de Biologia do Desenvolvimento).



Segundo ANDRADE e colaboradores (1999), as aranhas *Loxosceles* spp. são as principais responsáveis por casos de envenenamento no Brasil, sendo encontradas três espécies: *Loxosceles intermedia* MELLO LEITÃO, 1934; *L. laeta* NICOLET, 1849 e *L. gaucho* GERTSCH, 1967 (ANDRADE et al., 1999).

FISCHER (1996) descreve o gênero *Loxosceles* como aranhas primitivas, construtoras de teias irregulares, de hábitos noturnos e adaptadas ao meio urbano. *Loxosceles intermedia* encaixa-se nessa descrição, sendo encontrada em residências na cidade de Curitiba e região metropolitana. Consequentemente, o número de acidentes por picada de aranha marrom demonstra-se elevado, tornando a situação um caso de saúde pública.

Como pouco se sabe a respeito não somente do gênero *Loxosceles*, mas também a respeito da ordem Araneae, as perspectivas para se encontrar uma estratégia, a curto prazo, que diminua o número de ocorrências de acidentes são quase inexistentes.

Os trabalhos já realizados sobre a reprodução e o desenvolvimento de *Loxosceles intermedia* talvez possam contribuir para um futuro controle populacional da espécie, porém, ainda que essa possibilidade seja remota, o estudo por si só já possui grande importância para a Biologia do Desenvolvimento e para a pesquisa, pois concentra-se em um grupo de difícil análise devido aos problemas para se conseguir realizar o processamento dos espécimens em laboratório e à falta de informações na literatura a respeito do grupo.

## 1.2 OVOGÊNESE NA *Loxosceles intermedia*

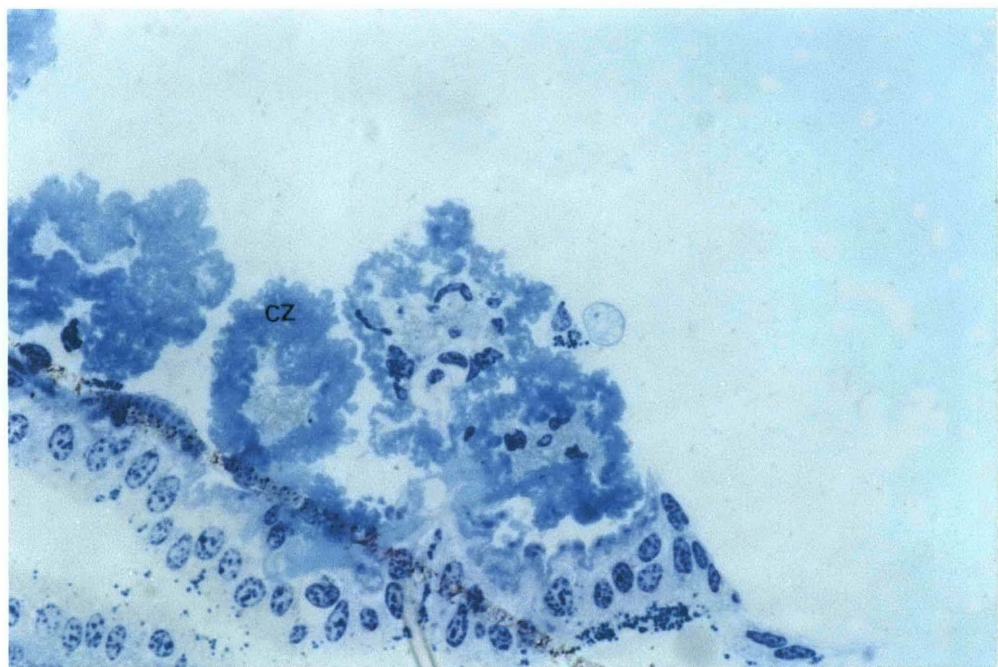
A aranha *Loxosceles intermedia* apresenta um par de ovários localizados ventralmente no abdome, conforme descrito para a ordem Araneae. (FELGENHAUER, 1999). Cada ovário apresenta um oviduto e os dois unidos formam o útero (MORISHITA et al., 2003). Encontram-se ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento no mesmo ovário (Figura 2), sendo que o processo de diferenciação dos mesmos pode ser dividido em 6 fases (MORISHITA, 2003). Inicialmente os ovócitos encontram-se presos à parede do ovário, envoltos por células epiteliais, das quais podem ser diferenciados através de seus núcleos aumentados. À medida que o amadurecimento acontece o conteúdo citoplasmático passa a aumentar, o processo de vitelogênese avança e os ovócitos passam a se destacar da parede do ovário, permanecendo ligados à mesma por pedúnculos constituídos de células epiteliais (Figura 3). Quando os ovócitos se apresentam totalmente maduros, são liberados para dentro do lúmen ovariano, após o afastamento das células pedunculares.

Figura 2: Fotografia de um par de ovários de *L. intermedia*: ovócitos (seta) em diferentes estágios de desenvolvimento. (Fonte: MORISHITA, 1999).

O local onde ocorre a fertilização também é uma questão discutida em *L. intermedia*, mas acredita-se que o útero é o local mais provável, o que indicaria uma fecundação interna como já descrito na aranha *Achaearanea tepidariorum* (SUZUKI, 1995). Segundo este autor, nesta espécie os espermatozóides são ativados antes da oviposição e migram para a cavidade ovariana através dos ductos de fertilização e ovidutos, porém, não se sabe exatamente quando a fecundação acontece.

Em aranhas adultas de *L. intermedia* foram encontradas cicatrizes formadas pela membrana basal e pela banda proteica após a liberação dos ovócitos (MORISHITA, 2003) (Figura 4), porém, em aranhas jovens essas cicatrizes não foram observadas, demonstrando que a primeira reprodução ainda não ocorreu, pois nenhum ovócito foi liberado no lúmen ovariano (SANTIAGO FILHA, 2003). No caso de *Buthotus judaicus* (WARBURG; ROSENBERG, 1992), cicatrizes também são formadas, mas são minúsculas e provêm da degeneração dos pedúnculos.

Figura 4: Fotografia de um corte longitudinal de ovário de *L. intermedia* corado com azul de toluidina: cicatrizes (cz) formadas após a liberação dos ovócitos no lúmen ovariano (lo). (Fonte: SANTIAGO FILHA, 2002).





A divisão do processo de diferenciação dos ovócitos em diferentes fases observada em *L. intermedia* também foi encontrada em *Hypostomus cf tietensis* (FÁVARO; CHAVES, 1999). O processo também se caracteriza pelo aumento gradativo dos ovócitos, cujos citoplasmas de basófilos passam a ser eosinófilos à medida que a vitelogênese avança.

A presença de pedúnculos conectando os ovócitos à parede do ovário (MORISHITA, 1999) se assemelha com o que foi observado nas aranhas *Ramphobeteus sorocabae* (VALENTE, 1984) e *Plexippus paykulli* (OSAKI, 1972), nas quais as células epiteliais cumprem esse papel.

Assim como no caso de *Schizomus sawadai* (MIYAZAKI et al., 2001), nenhuma célula folicular ou “nurse cells” foram observadas. Possivelmente, as células pedunculares cumprem essa função, pois conforme foi observado por MORISHITA (2003), microvilosidades são encontradas entre células pedunculares e ovócitos, além de vesículas de pinocitose nos últimos. Tais observações levam a crer que talvez haja alguma influência das células pedunculares no desenvolvimento dos ovócitos, como por exemplo, no processo de vitelogênese. Este, por sua vez, é fonte de controvérsias, pois ainda não há evidências de que o vitelo tenha procedência da hemolinfa, do hepatopâncreas ou do pedúnculo. Em *Carausius morosus* (GIORGI et al., 1993), notou-se que várias moléculas encontradas no vitelo tinham reação imunocitoquímica semelhante a da hemolinfa da fêmea, o que poderia indicar alguma relação entre os dois. Já no camarão *Macrobrachium rosenbergii* (SOROKA et al., 2000) foram encontrados precursores do vitelo em altas concentrações tanto na hemolinfa quanto no hepatopâncreas, acreditando o autor que proteínas são produzidas inicialmente no hepatopâncreas e após glicosilação e incorporação de lipídios e carotenóides, necessários à produção do precursor do vitelo, este é secretado na hemolinfa e acumulado com algumas mudanças no ovário.

Para indivíduos adultos de *L. intermedia* foi observada por MORISHITA (2003) uma banda proteica entre o envoltório vitelínico e a membrana plasmática que, segundo a autora, pode estar envolvida na sustentação do ovócito. Tal banda não foi encontrada por SANTIAGO FILHA (2003) no ovário de fêmeas jovens. Essas apresentam ovócitos até o estágio IV com citoplasma rico em RNAs detectados através de colorações com verde de metila. De acordo com a autora, ovócitos são encontrados somente nos estágios iniciais em ovário de fêmeas jovens.

Outra diferença entre é a presença de grânulos eosinófilos no lúmen ovariano das adultas e ausência destes no ovário das jovens. SANTIAGO FILHA (2003) relata que tais grânulos são semelhantes aos encontrados no córion do ovo.

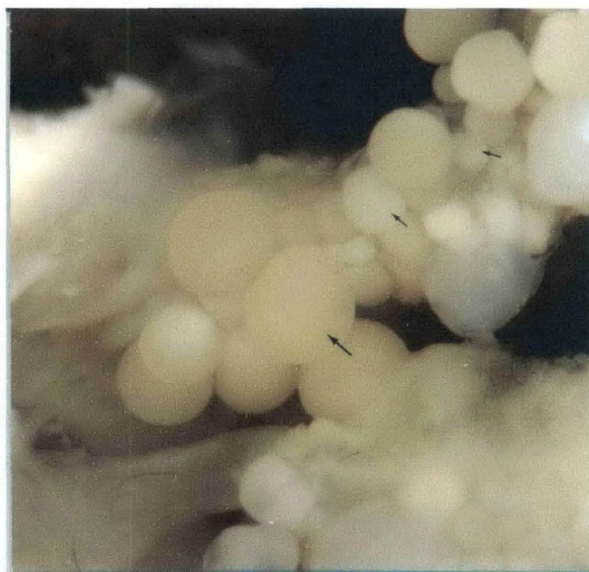
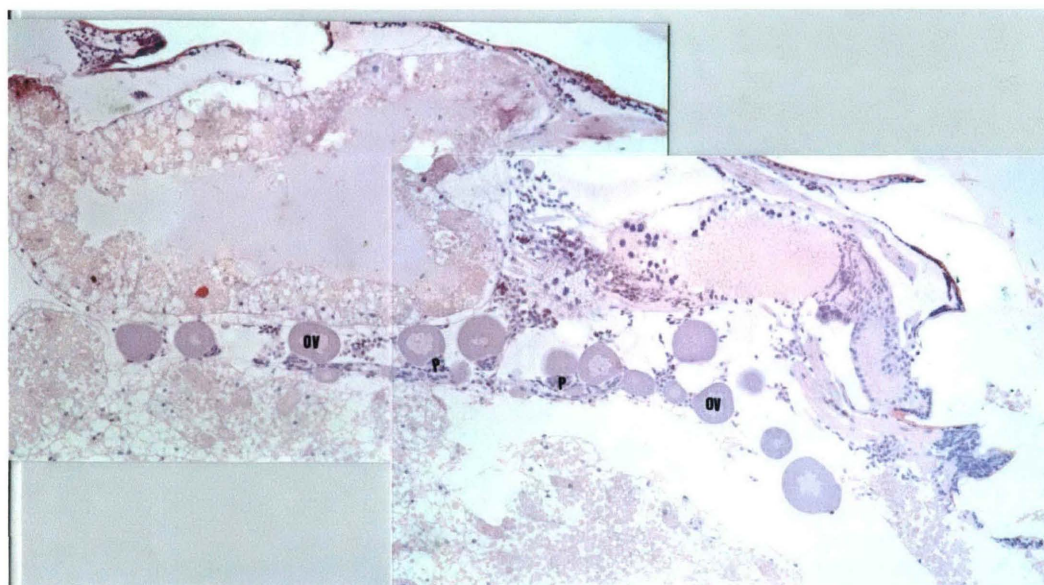


Figura 3: Fotografia de um corte longitudinal de ovário de *L. intermedia* corado com HE, aumento: 160x. Pedúnculo (P); ovócito (OV). (Fonte: SANTIAGO FILHA, 2003).



### 1.3 INFLUÊNCIA DAS MOLÉCULAS CLÁSSICAS DE ADESÃO NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Caderinas são glicoproteínas transmembranas, encontradas nas junções entre células epiteliais e dependente de cálcio, na presença do qual se ligam com caderinas de células adjacentes através de ligações hidrofóbicas (GARTNER; HYATT, 1999). Seu domínio citoplasmático se conecta a um feixe de filamentos de actina que além de apresentarem comunicações entre si também comunicam-se com a membrana plasmática por meio de moléculas como a vinculina e a catenina.

Algumas caderinas são tidas como clássicas, como por exemplo as caderinas das famílias E e N e, segundo YAP e KOVAKS (2002), essas caderinas são determinantes na coesão dos tecidos durante e após o desenvolvimento embrionário. Tal afirmação é corroborada por vários estudos envolvendo a caderina no desenvolvimento de diferentes grupos, animais como os anfíbios e os insetos. Porém, estão relacionadas a distintos processos como a ancoragem de células tronco de linhagem germinativa em seus nichos ovarianos em *Drosophila* (SONG et al., 2002), a migração de células foliculares na superfície de células germinativas também em *Drosophila* (NIEWIADOMSKA et al., 1999) e a sinalização celular (YAP; KOVAKS, 2002).

No caso da *L. intermedia* a marcação de caderinas foi observada em microscopia de luz na parede ventral do ovário, ao redor de ovócitos em início de diferenciação e em torno de todo o perímetro dos ovócitos mais maduros. Também foi observada marcação nas células pedunculares e no citoplasma dos ovócitos (MORISHITA, 2003). Segundo a autora, caderinas foram encontradas nos mesmos locais das junções gap, talvez atuando como um pré-requisito para as mesmas que, por sua vez, podem atuar na sinalização e no transporte de moléculas.

### 1.4 PROCESSAMENTO DOS OVÁRIOS DE FÊMEAS JOVENS DE *Loxosceles intermedia* PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os ovários de jovens de *L. intermedia* para serem observados ao microscópio eletrônico de transmissão precisam passar por um processamento específico do material para observação em

altas magnificações. Trabalhos anteriores feitos no laboratório de Biologia do Desenvolvimento do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná não alcançaram resultados satisfatórios, obtendo-se pobre preservação da ultraestrutura das células. Uma análise detalhada do papel dos vários passos empregados no preparo dos espécimens se faz necessário para permitir uma adequada análise ultraestrutural dos ovários da aranha – marrom.

A fixação química é realizada, através do uso de glutaraldeído e/ou do paraformaldeído. Tal fixação é responsável pela estabilização de macromoléculas, sendo que os fixadores reagem com sítios específicos das mesmas através de ligações cruzadas. Esses fixadores são chamados aditivos, pois são incorporados aos tecidos, ao contrário do etanol, chamado não aditivo e responsável pela desnaturação de proteínas que passam, então, a exibir radicais hidrofóbicos e finalmente precipitam (HADDAD et al., 1998).

O glutaraldeído não só estabiliza a estrutura fina, como aumenta a permeabilidade dos tecidos ao meio de embebição (HAYAT, 1970). É o fixador que causa o menor impacto na conformação das proteínas, no entanto, dificulta a obtenção de um contraste eficiente do material.

O paraformaldeído é o formaldeído sem metanol, cuja presença na solução fixadora prejudica a observação, pois extrai boa parte do material do citoplasma e das membranas da célula. O paraformaldeído não apresenta a mesma capacidade de preservação do glutaraldeído, mas, também não é tão prejudicial às propriedades imunogênicas das moléculas, pois acarreta poucas ligações cruzadas, permitindo que o número de sítios antigênicos reativos seja considerável (HADDAD et al., 1998).

Para lavagens e para veículo dos fixadores um dos tampões utilizados é o tampão fosfato, considerado o tampão mais fisiológico porque é encontrado em células na forma de fosfatos inorgânicos e éster de fosfato. Possui importância, como todos os tampões, na manutenção do pH que não pode variar para não causar alterações nas moléculas e consequentemente nas estruturas celulares. Essas soluções contêm bases ou ácidos fracos, consequentemente, pouco dissociáveis, impedindo a acidificação da solução fixadora (HADDAD et al., 1998).

Outro tampão utilizado é o cacodilato que ajuda na preservação da atividade de determinadas enzimas, possui resistência à contaminação com bactérias e ao contrário do tampão fosfato, não apresenta o risco de liberar íons fosfato no material, porém apresenta arsênico na sua fórmula, o que o torna perigoso para o manipulador (HAYAT, 1970).

A pós – fixação, em geral, é feita com tetróxido de ósmio que permite uma melhor preservação ultraestrutural, estabilizando principalmente fosfolipídios de membranas plasmáticas, com afinidade pelos ácidos graxos insaturados, ou seja, os que apresentam ligações duplas (HADDAD et al., 1998).

Os meios de inclusão para a microscopia eletrônica não são miscíveis em água, é necessário desidratar o material para que o álcool, com o qual a resina é miscível, possa penetrar. Tal desidratação é gradual, através de uma série crescente de etanol, impedindo o colapamento das estruturas.

O óxido de propileno é utilizado após a desidratação e antes da infiltração para facilitar a entrada da resina no material, pois possui baixa viscosidade dissolve a resina mais rapidamente que o etanol, além de infiltrar prontamente e ser totalmente miscível com a água. Os lipídios facilmente são extraídos pelo óxido de propileno, podendo este retirar até mesmo os lipídios fixados (HADDAD et al., 1998).

A inclusão pode ser realizada em SPURR, resina especial cuja viscosidade é baixa e portanto, ideal para materiais de penetração difícil.

Para permitir uma boa preservação da estruturas é essencial se fazer a medida da osmolaridade das soluções fixadoras e tamponantes. Osmolaridade representa o número de mols de partículas osmoticamente ativas por litro de soluções (HADDAD et al., 1998). A medição deve ser feita para impedir que as soluções sejam hipotônicas em relação à hemolinfa da aranha. A hipotonicidade da solução provocaria a entrada de água nas células resultando na má preservação do material enquanto o uso de solução causaria o colapamento do citoplasma através da brusca saída de água das mesmas.

Buscou-se nesse trabalho analisara todos estas condições para se obter a situação ótima de preservação que permitisse o estudo detalhado de ultraestrutura dos ovários de *L. intermedia*.

Em trabalhos anteriores os resultados obtidos estiveram longe do ideal, especialmente quando buscou-se analisar as interações celulares.



## 2 OBJETIVOS

- Testar diferentes soluções fixadoras para se obter boa uma preservação ultraestrutural de ovários de *L. intermedia*
- Testar uma marcação imunocitoquímica para detecção, ao microscópio eletrônico de transmissão, de caderinas nas junções aderentes entre as células epiteliais do ovário e ao redor de ovócitos em início de diferenciação.

### **3.MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 PADRONIZAÇÃO DA FIXAÇÃO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO**

Para se obter uma melhor preservação do ovário a fim de se observar ao microscópio eletrônico de transmissão foram experimentados diferentes fixadores e procedimentos visando obter soluções com osmolaridades próximas ao fluido da aranha.

- Solução com paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2%, em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 fixação em geladeira a 4° C por 3 horas
- Solução com paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2%, NaCl 50mM em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 fixação em geladeira a 4° C por 3 horas
- Solução com paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2%, cacodilato de sódio 0,1M, NaCl 0,2M fixação em geladeira a 4° C por 3 horas
- Solução com paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2%, cacodilato de sódio 0,1M, NaCl 0,25M fixação em geladeira a 4° C por 3 horas

As osmolaridades das soluções fixadoras e tamponantes foram medidas através de um microsmômetro de pressão de vapor (Wescor EUA VAPRO 5520) antes do processamento do material para os quatro experimentos.

O material também foi processado para microscopia eletrônica de transmissão passando por uranila 0.5% e ósmio 1%, porém, não foi colocado em óxido de propileno e os cortes ultrafinos foram contrastados com uranila 5% por 30 minutos e citrato de chumbo por 10 minutos.

#### **3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO PARA DETECÇÃO DA PRESENÇA DE CADERINAS**

Utilizou-se para esta análise imunocitoquímica protocolo já testado para outros tecidos ou para análise em microscopia de luz (MORISHITA, 2003).

Aranhas jovens em diferentes estágios de desenvolvimento foram selecionadas e fixadas em solução com paraformaldeído 2% em solução tampão fosfato 0,1M pH 7,4 com NaCl 80 mM. Após a fixação, o material foi lavado em TTBS (Salina tamponada com Tris pH 7,5 100mM;

NaCl 150mM e Tween 20 0,1%) e em seguida em TTBS (TTBS + Saponina). O material passou pela solução bloqueadora da peroxidase endógena com água oxigenada a 0.5%, sendo a seguir bloqueada com soro albumina bovina a 1% (BSA) em TTBS. Após permanecer 2 horas no soro de cabra a 10% com BSA de 0,1%, os ovários foram deixados, durante uma noite em solução bloqueadora com anticorpo de coelho anti-pan-caderina, diluído na proporção de 1:1000. Ovários controle foram incubados sem anticorpo primário.

No dia seguinte, o material foi lavado em TTBS e fixado em solução de paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2% em tampão fosfato 0.1M pH 7.4. Após a fixação os ovários foram novamente lavados com TTBS, deixados uma hora no BSA 1%, duas horas no soro de cabra e por último em anticorpo secundário anti - IgG de coelho, feito em burro, durante a noite.

No terceiro dia o material foi lavado em TTBS e colocado na solução de diaminobenzidina (DAB 0,05%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01% em TTBS) para com o objetivo de marcar complexo formado pelos anticorpos e a peroxidase. Em seguida foi realizada uma lavagem com TTBS, sendo o material deixado em ósmio 1% durante 1 hora. Em seguida o material foi desidratado, tratado com óxido de propileno e em infiltrado em óxido de propileno: resina. No dia seguinte os ovários foram incluídos em SPURR.

Os cortes semifinos de 900 nm foram corados com azul de toluidina e os cortes ultrafinos de 70 nm foram observados sem contraste.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PADRONIZAÇÃO DA FIXAÇÃO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Quatro experimentos foram realizados simultaneamente, utilizando-se distintas soluções fixadoras e tamponantes para se observar o poder de penetração e a capacidade de preservação das soluções de acordo com suas distintas concentrações osmóticas, pois a osmolaridade exerce influência significativa na qualidade da preservação do material (HAYAT, 1970). O autor afirma que em relação à osmolaridade total da solução fixadora, a concentração do veículo dos fixadores parece ser mais importante que a do glutaraldeído, pois este não exerce efeito osmótico considerável. A concentração de glutaraldeído pode ser modificada dentro de um extenso intervalo com relativamente pouca alteração na morfologia da estrutura fina.

No entanto, as soluções fixadoras utilizadas no presente trabalho, assim como a hemolinfa da aranha *L. intermedia*, tiveram suas osmolaridades medidas com o glutaraldeído e o paraformaldeído já acrescentados. Os resultados foram os seguintes:

- Hemolinfa da aranha *L. intermedia*: 543 mosmol/ Kg H<sub>2</sub>O.
- Solução com paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2%, em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 : 644 mosmol/ Kg H<sub>2</sub>O; solução tampão fosfato 0,1M pH 7,4: 222 mosmol/ Kg H<sub>2</sub>O.
- Solução com paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2%, NaCl 50mM , em tampão fosfato 0,1M pH 7,4: 681 mosmol/ Kg H<sub>2</sub>O; solução tampão fosfato 0,1M pH 7,4 mosmol/ Kg H<sub>2</sub>O.
- Solução com paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2%, cacodilato de sódio 0,1M, NaCl 0,2M: 965 mosmol/ Kg H<sub>2</sub>O; tampão cacodilato de sódio 0,1M: 510 mosmol/Kg H<sub>2</sub>O.
- Solução com paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2%, cacodilato de sódio 0,1M, NaCl 0,25M: 1.041 mosmol/ Kg H<sub>2</sub>O; tampão cacodilato de sódio 0,1M: 603/ Kg H<sub>2</sub>O.

A diferença entre a osmolaridade das soluções tamponantes e as soluções contendo os fixadores é grande, isto é, a presença do glutaraldeído e do paraformaldeído faz diferença na osmolaridade final.

O primeiro experimento apresentava solução fixadora com osmolaridade um pouco mais elevada que a osmolaridade da hemolinfa da aranha *L. intermedia* que é de 543 mosmol/Kg H<sub>2</sub>O. Devido a essa leve hipertonicidade foi possível obter uma boa preservação do material, podendo-se observar os núcleos, os limites das células pelas suas membranas plasmáticas e os conteúdos citoplasmáticos, apesar desses últimos se apresentarem edemaciados (Figura 5). A observação das mitocôndrias mostrou cristas mitocondriais com aspecto normal, sem alterações dos espaços entre membranas (Figura 6).

O segundo experimento apresentava solução fixadora com NaCl para impedir a entrada de água nas células junto com os aldeídos, facilitando a preservação das estruturas. A presença do NaCl fez pouca diferença na osmolaridade tanto da solução fixadora quanto da tamponante. Os resultados dessa fixação não puderam ser analisados porque o aspecto dos cortes não permitiu, parecendo que não haviam sido totalmente distendidos (Figura 7). É necessária uma repetição desse experimento para que se possa chegar a uma conclusão.

O terceiro experimento apresentou uma solução fixadora com osmolaridade bastante elevada em relação à osmolaridade da hemolinfa da aranha, sendo que tal hipertonicidade provavelmente foi a causa do rompimento de algumas células do epitélio ovariano, no entanto, essa fixação foi a que permitiu a melhor preservação dentre todas. Foi possível observar a preservação das membranas que geralmente são utilizadas como parâmetro para análises, além de organelas como mitocôndrias e suas cristas (Figura 8), interdigitações entre as células pedunculares (Figuras 9 e 10) e complexo de Golgi (Figura 11). É contraditório encontrar em um mesmo ovário células com suas estruturas tão bem preservadas e células com seus citoplasmas extravasados, mas parece que as células pedunculares podem ser bem analisadas através do uso do cacodilato de sódio e do NaCl nas concentrações utilizadas.

O quarto experimento também contava com o mesmo tampão e o mesmo sal em concentração mais elevada, mas não foi notada nenhuma região com células no mesmo nível de preservação. Os núcleos também foram afetados, apresentando um aspecto modificado em relação ao observado normalmente (Figura 12), sem a possibilidade de se observar organelas ou membranas nitidamente. Talvez a hipertonicidade dessa solução fixadora seja demasiada, notando-se que a solução tamponante sozinha já apresenta osmolaridade de 603 mosmol/Kg H<sub>2</sub>O que é maior que a da hemolinfa.

Os quatro experimentos realizados levam a crer que o cacodilato e o NaCl juntos podem fornecer uma considerável preservação das células desde que se leve em conta a concentração de cada um, mas ainda é necessário que novas tentativas sejam feitas para se conseguir uma fixação ideal que até agora não foi atingida.

Para futuros experimentos é importante atentar para uma observação feita por HADDAD et al. (1998) dizendo que para uma penetração mais rápida dos fixadores é preciso que o veículo seja hipertônico em relação à hemolinfa e não iso ou hipotônico. Essa observação demonstra a importância de se saber a osmolaridade das soluções, pois da fixação vão depender os resultados finais.

### **3.3.4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO PARA DETECÇÃO DA PRESENÇA DE CADERINAS**

A marcação imunocitoquímica realizada visava detectar a presença de caderina nas junções aderentes entre as células epiteliais do ovário, ao redor de ovócitos em início de diferenciação ou no interior dos ovócitos já pedunculados. Porém, nenhuma marcação foi observada a não ser no hepatopâncreas (Figura 13), pois as membranas plasmáticas das células romperam-se e os conteúdos citoplasmáticos extravasaram (Figura 14 e 15), permanecendo apenas os núcleos das células. Tal situação provavelmente é devido ao longo período de tempo transcorrido entre a morte dos espécimens e a fixação dos ovários em solução fixadora contendo glutaraldeído que é o fixador próprio para preservar a ultraestrutura, permitindo a observação ao microscópio eletrônico de transmissão. Como o protocolo de imunocitoquímica demanda a presença de um anticorpo primário para se ligar à molécula em questão, é preciso que a mesma tenha seus sítios antigênicos preservados. No entanto, o glutaraldeído apresenta a capacidade de se fixar às moléculas, modificando as suas conformações, o que pode vir a interferir nas ligações com os anticorpos (HADDAD et al., 1998). Para tentar evitar esse problema a fixação com glutaraldeído foi feita no dia seguinte ao início do processamento dos ovários, o que acabou prejudicando a preservação das membranas e do citosol.

Uma sugestão feita pelo próprio HADDAD et al. (1998) é o uso de glutaraldeído em baixas concentrações (entre 0.05 % e 1%) associado ao formaldeído. Tal sugestão foi colocada em prática, mas não forneceu resultados porque as aranhas utilizadas nessa tentativa eram muito

pequenas, o que dificultou a dissecação das mesmas, demandando a inclusão do abdome inteiro na resina. No entanto, a presença da quitina envolvendo o abdome não permitiu a entrada do tetróxido de ósmio e do SPURR, atuando como uma barreira à pós fixação e infiltração.

Nas tentativas de se observar a presença da caderina foi utilizada a diaminobenzidina (DAB) para detectar a atividade da enzima peroxidase, ligada ao anticorpo secundário. Consultas posteriores à literatura mostraram que as reações entre o tetróxido de ósmio e o DAB oxidado resultam em uma imagem preta e opaca que vem se mostrando inválida para pesquisa ultraestrutural. Como não foi possível preservar o material apropriadamente, tal imagem não foi observada, tendo sido notada somente uma possível imunomarcção no hepatopâncreas (Figura 13), mas a informação será levada em conta em futuras tentativas, nas quais o ósmio pode ser evitado ou, então, o ouro coloidal pode ser utilizado.

Outra sugestão feita por HADDAD et al. (1998) é a utilização de tampão fosfato ou cacodilato para imunomarcção no lugar do tampão TTBS com TRIS utilizado no presente trabalho, pois aminas como essa tendem a reagir com o glutaraldeído, prejudicando a observação.

Sendo assim, não foi possível observar ao microscópio eletrônico de transmissão a presença das caderinas no ovário das fêmeas jovens nem obter informações a respeito de sua atuação na ovogênese devido aos problemas para se conseguir preservar o material. Adaptações ao protocolo experimental estão sendo feitas visando obter a preservação dos tecidos aliada à manutenção dos epítomos.

Os objetivos principais desse trabalho não puderam ser atingidos devido à exiguidade de tempo. As tentativas levadas a efeito, no entanto, foram instrutivas para o aprendizado da metodologia de preparo de material para microscopia eletrônica de transmissão e para a compreensão de peculiaridades dos tecidos de aracnídeos. Isto aponta para a continuidade dos trabalhos com vistas à obtenção de resultados mais conclusivos.

## 5. FIGURAS



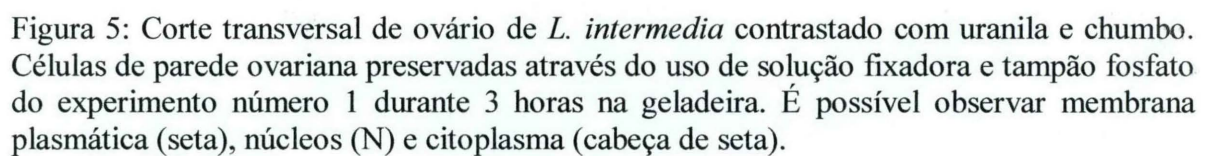
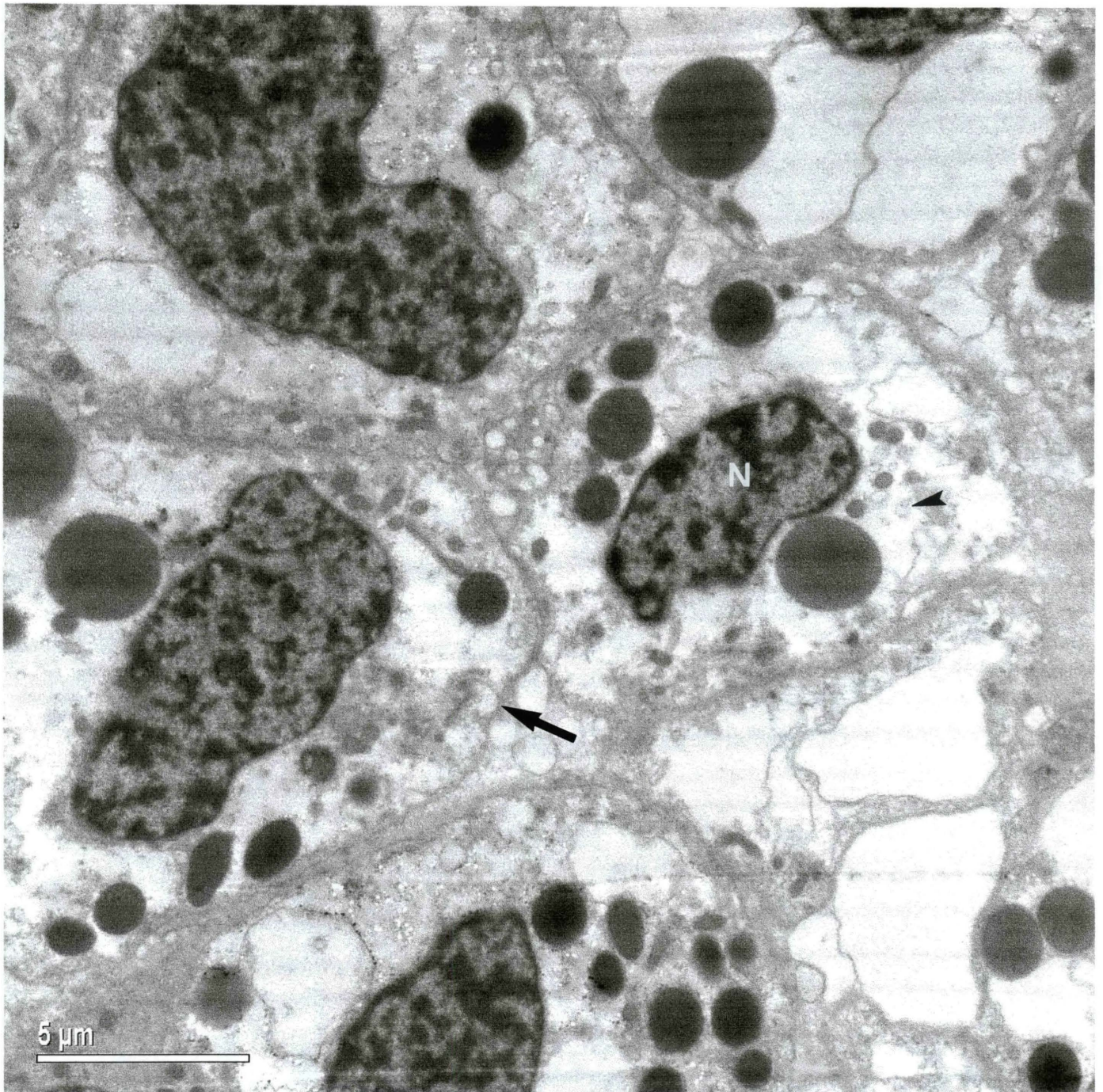


Figura 5: Corte transversal de ovário de *L. intermedia* contrastado com uranila e chumbo. Células de parede ovariana preservadas através do uso de solução fixadora e tampão fosfato do experimento número 1 durante 3 horas na geladeira. É possível observar membrana plasmática (seta), núcleos (N) e citoplasma (cabeça de seta).



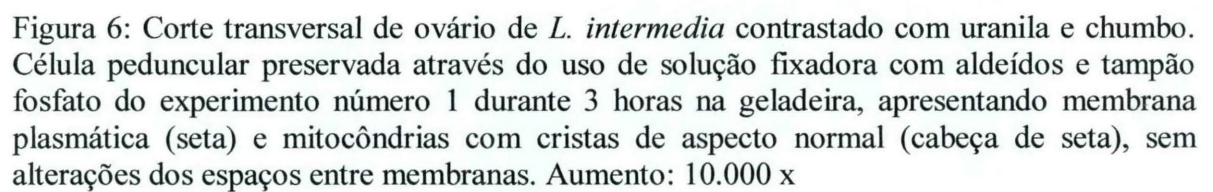


Figura 6: Corte transversal de ovário de *L. intermedia* contrastado com uranila e chumbo. Célula peduncular preservada através do uso de solução fixadora com aldeídos e tampão fosfato do experimento número 1 durante 3 horas na geladeira, apresentando membrana plasmática (seta) e mitocôndrias com cristas de aspecto normal (cabeça de seta), sem alterações dos espaços entre membranas. Aumento: 10.000 x

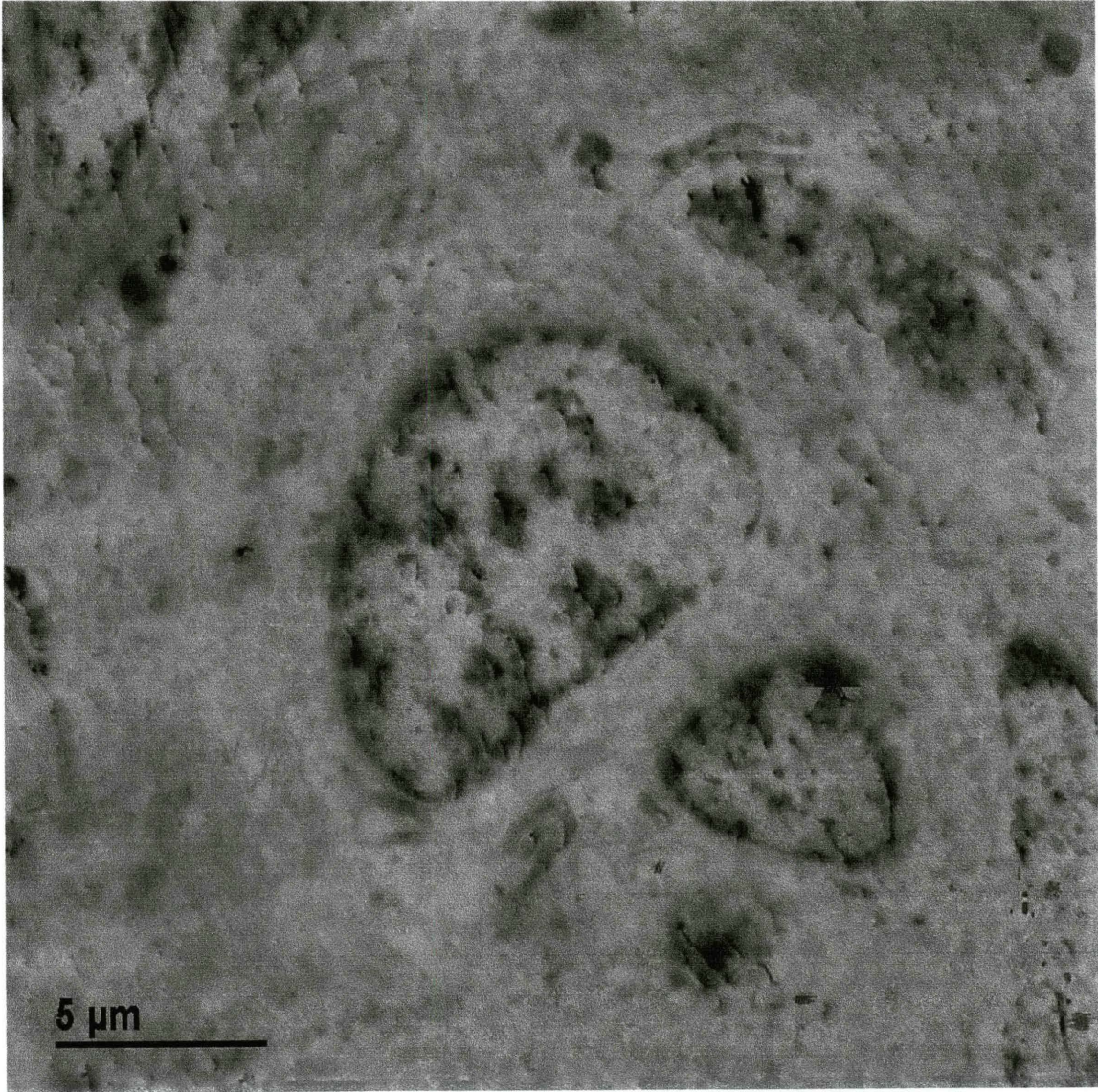






Figura 7: Corte transversal de ovário de *L. intermedia* contrastado com uranila e chumbo. Corte mal distendido e espesso impossibilitando a observação de organelas e limites citoplasmáticos com nitidez, o que impede a análise dos resultados do experimento número 2.






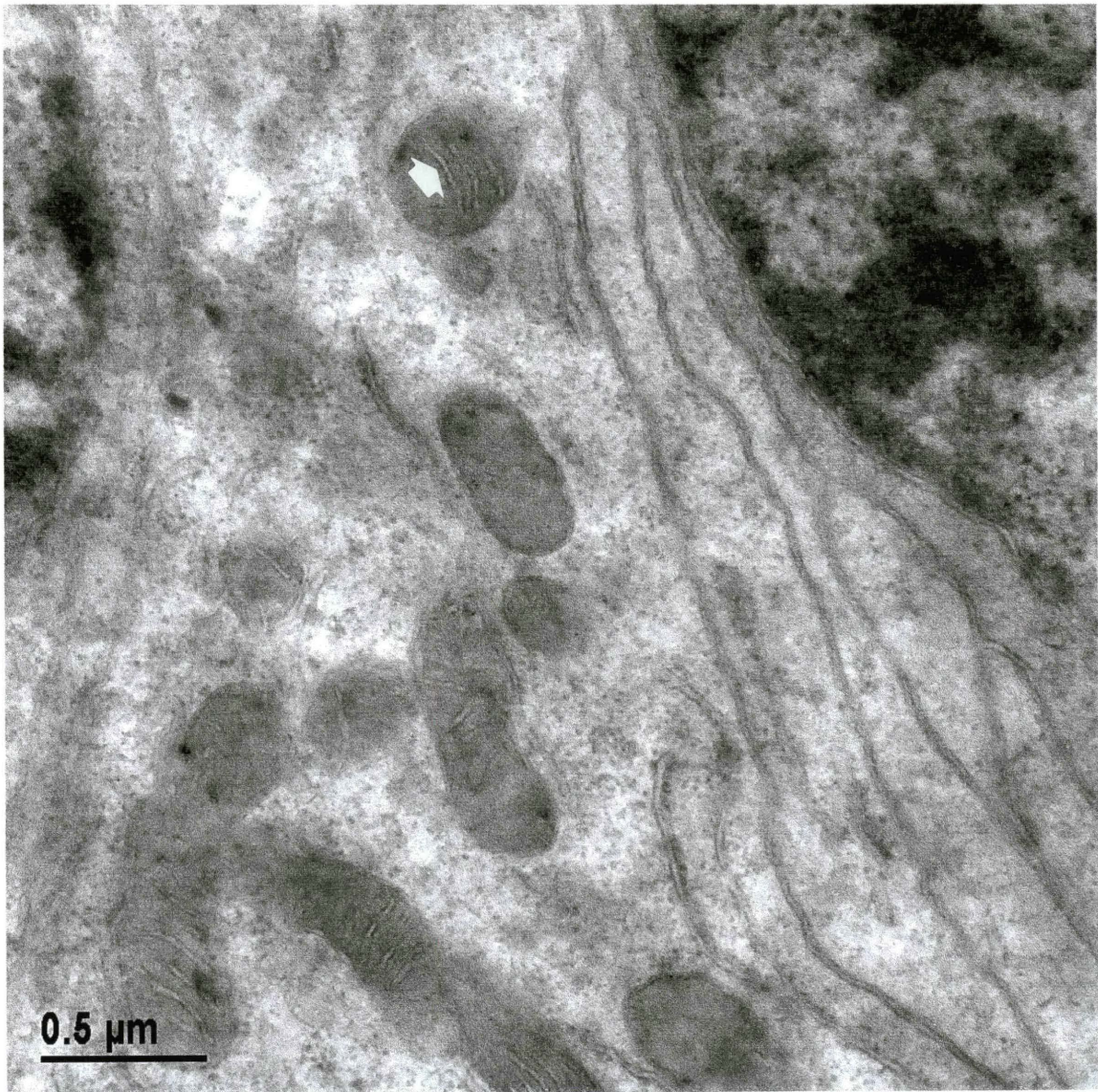


Figura 8: Corte transversal de ovário de *L. intermedia* contrastado com uranila e chumbo. A boa fixação do material com solução fixadora do experimento número 3 permite observar cristas mitocondriais de células pedunculares (seta).








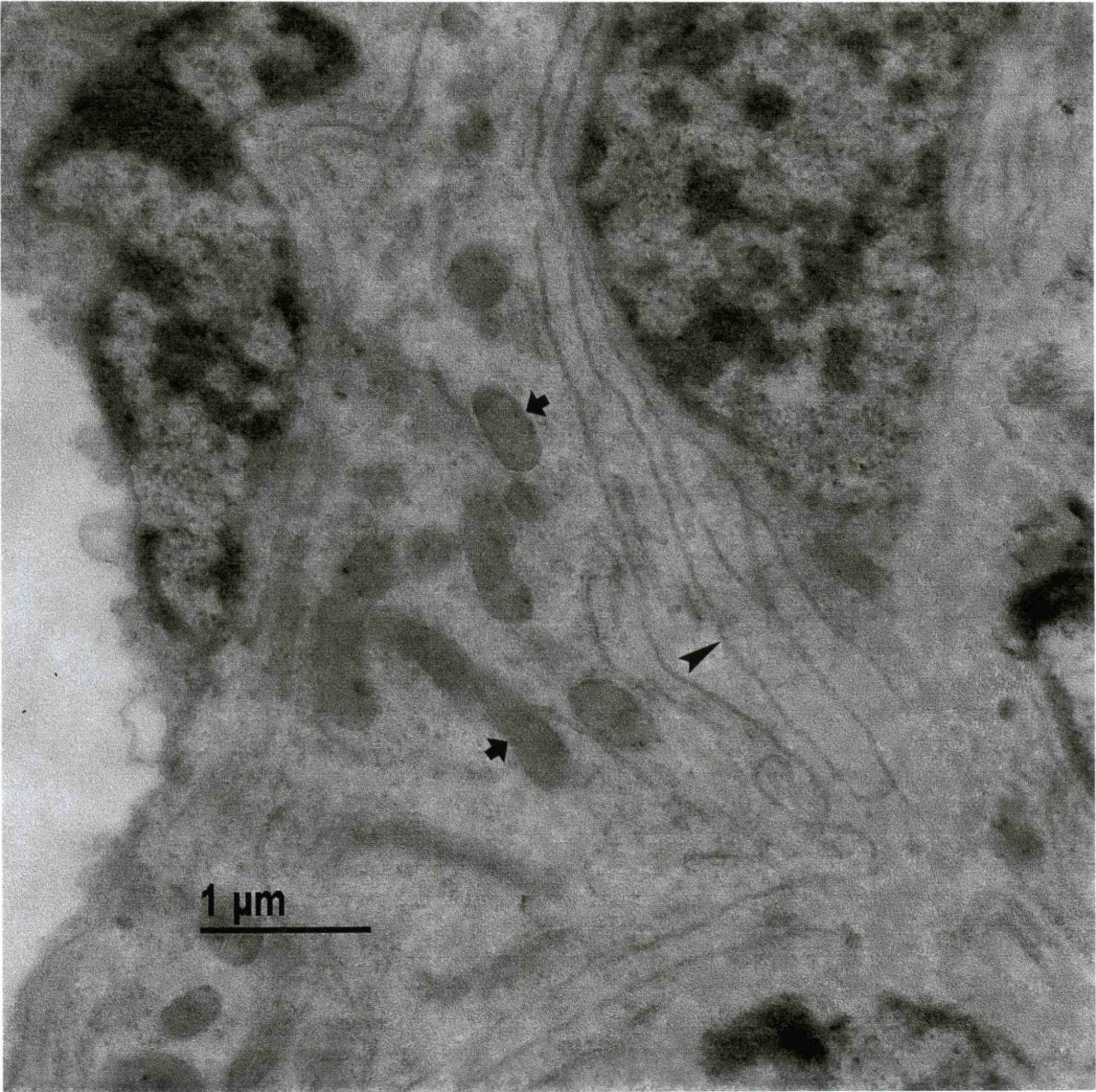


Figura 9: Corte transversal de ovário de *L. intermedia* contrastado com uranila e chumbo. Menor aumento da figura 8. É possível observar interdigitações (cabeça de seta) e mitocôndrias com cristas de aspecto normal (seta) observadas em células pedunculares.



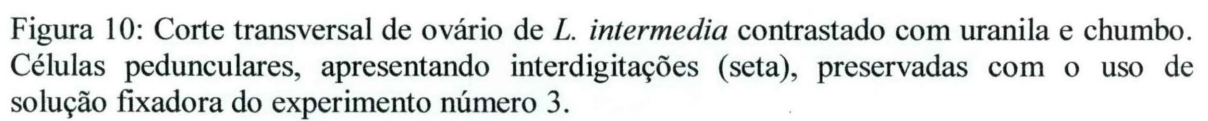
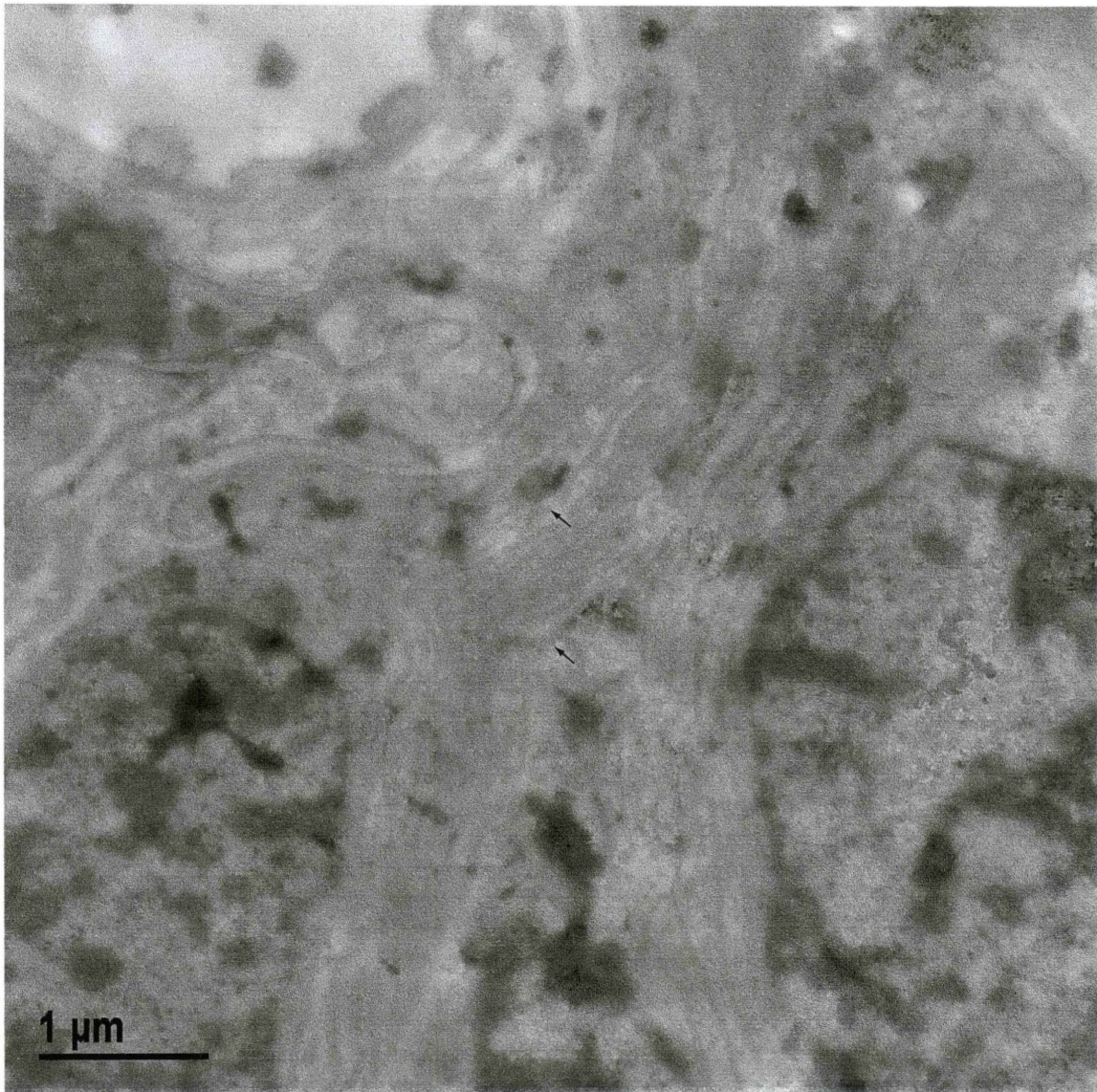


Figura 10: Corte transversal de ovário de *L. intermedia* contrastado com uranila e chumbo. Células pedunculares, apresentando interdigitações (seta), preservadas com o uso de solução fixadora do experimento número 3.






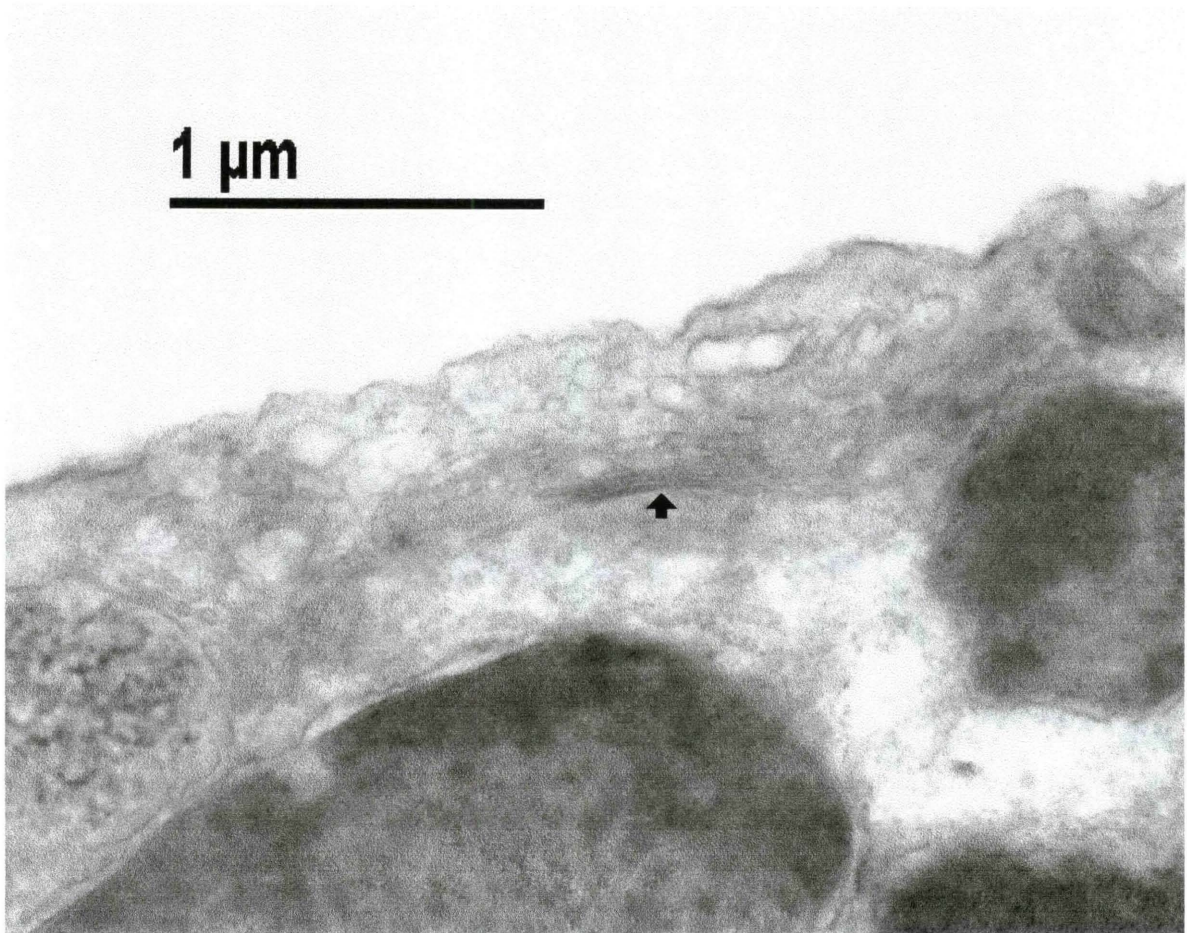


Figura 11: Corte transversal de ovário de *L. intermedia* contrastado com uranila e chumbo. Fixador do experimento número 3 apresentou bons resultados na preservação das membranas das células pedunculares, inclusive do complexo de Golgi (seta).





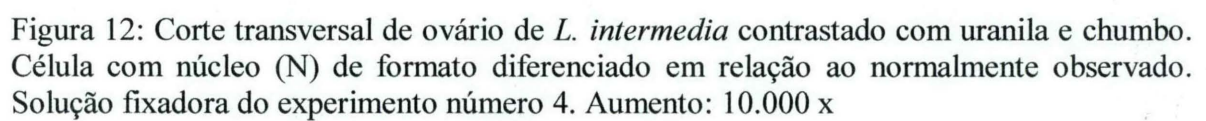


Figura 12: Corte transversal de ovário de *L. intermedia* contrastado com uranila e chumbo. Célula com núcleo (N) de formato diferenciado em relação ao normalmente observado. Solução fixadora do experimento número 4. Aumento: 10.000 x

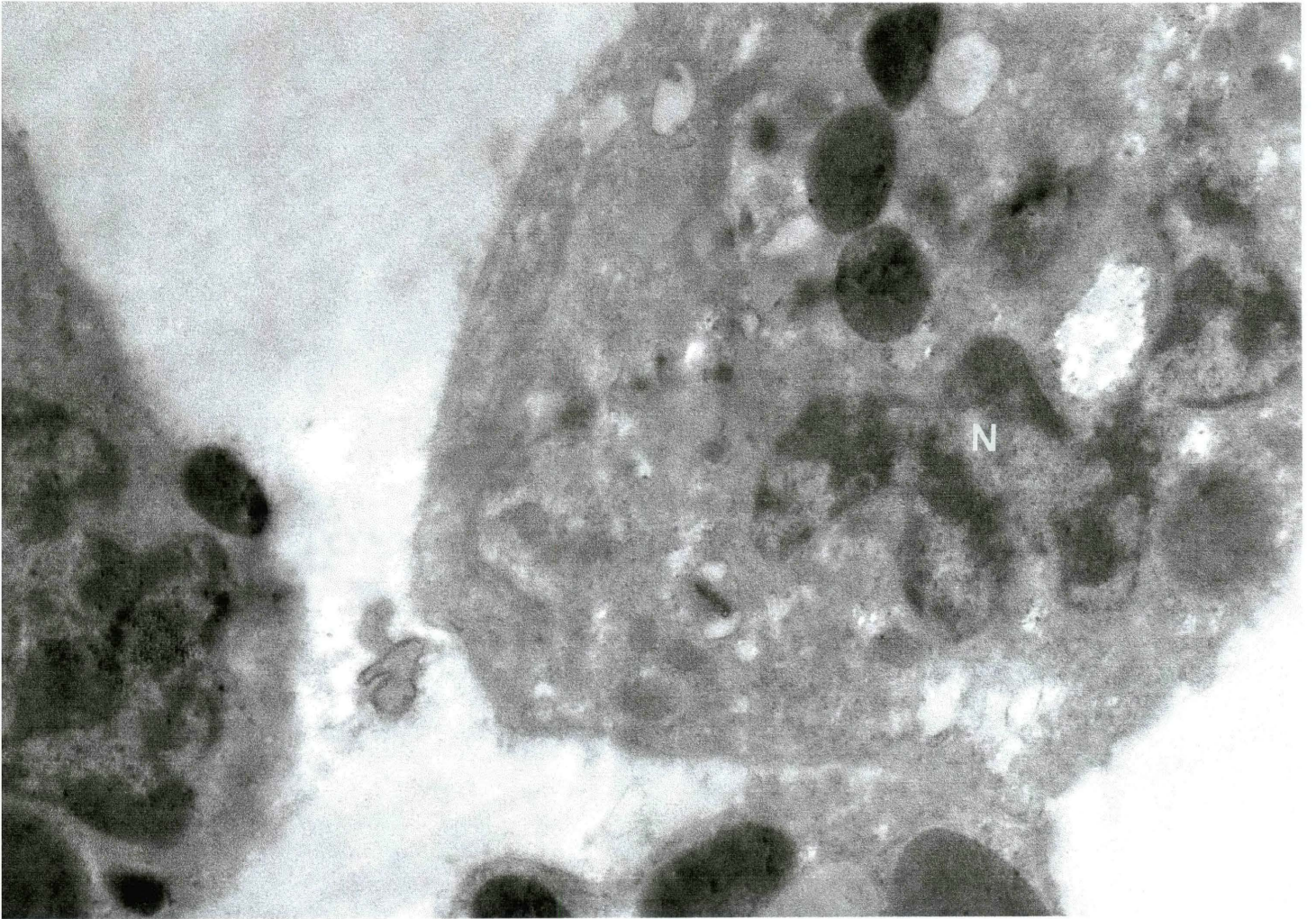
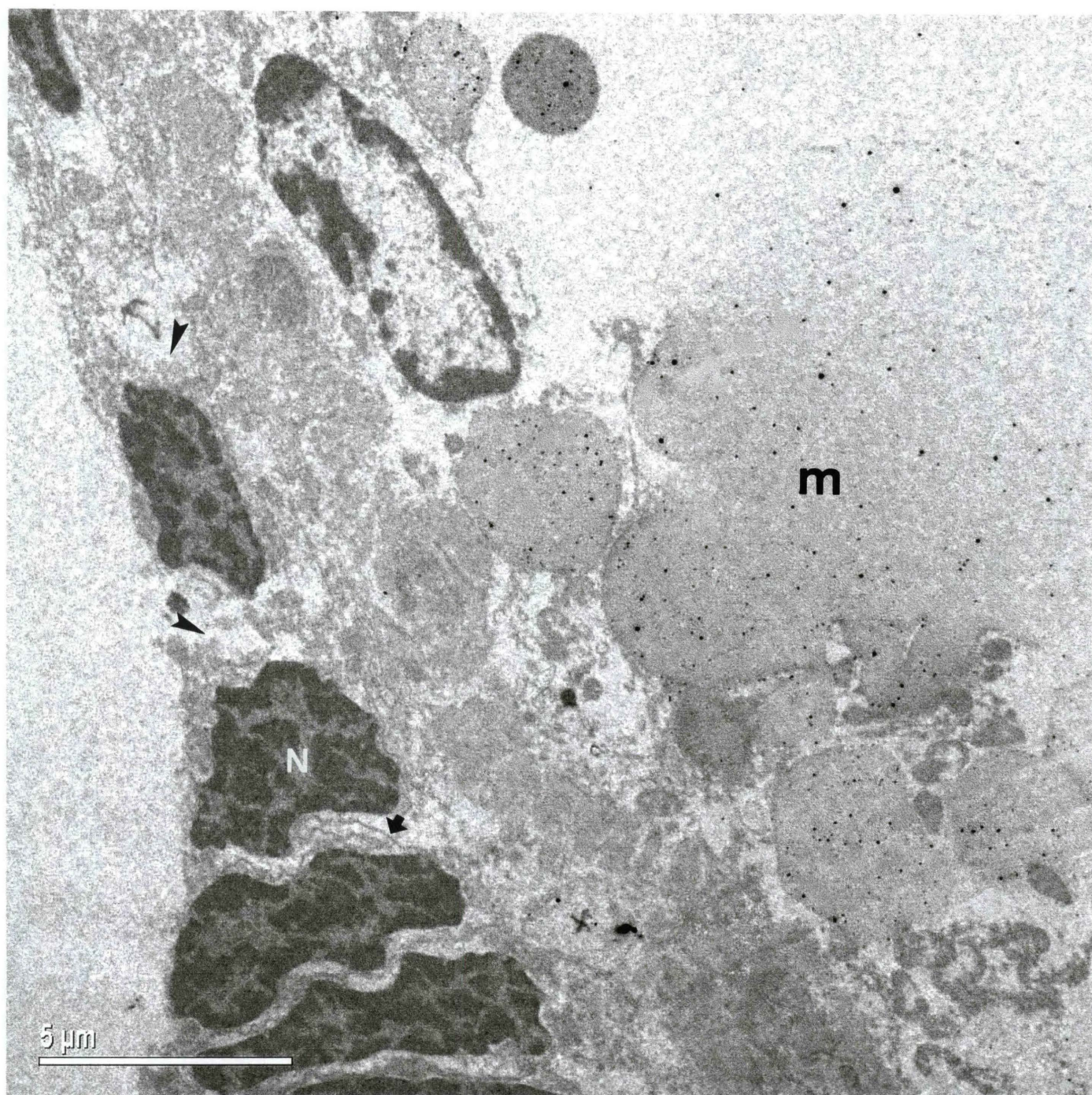




Figura 13: Corte transversal de ovário de *L. intermedia*, sem contraste. Devido ao longo período de tempo decorrido até ser realizada a fixação do material com glutaraldeído, as células se apresentam com membranas plasmáticas rompidas (seta), núcleos mal preservados (N) e conteúdos citoplasmáticos extravasados (cabeça de seta). O hepatopâncreas (m) apresenta depósitos eletrondensos que podem representar possível marcação de caderina citoplasmática.




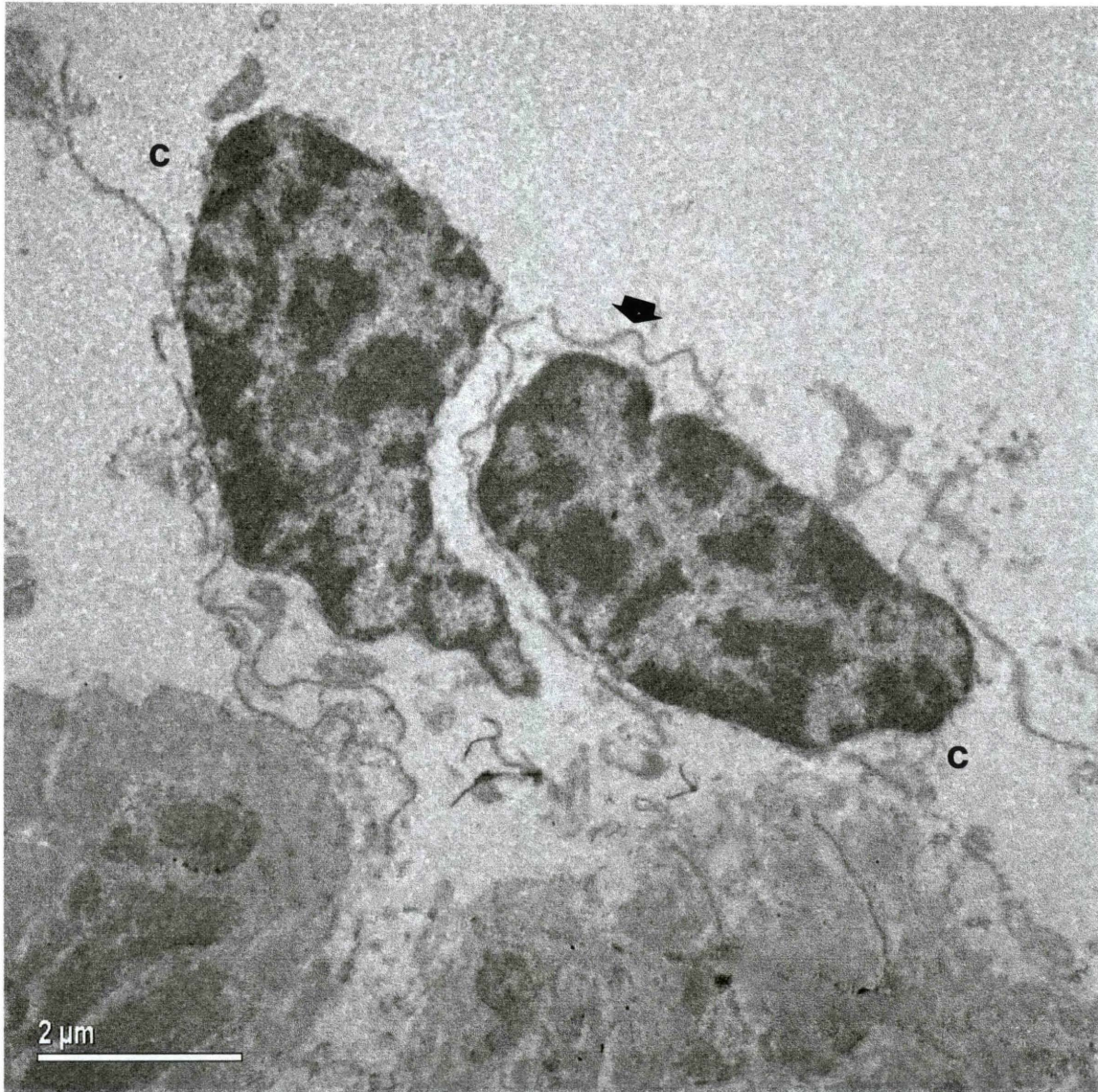


Figura 14: Corte transversal de ovário de *L. intermedia*, sem contraste. Membranas plasmáticas das células da parede do ovário rompidas (seta) e conteúdos citoplasmáticos extravasados (c) possivelmente devido ao longo tempo decorrido antes da fixação com glutaraldeído. Não é possível observar marcação imunocitoquímica.






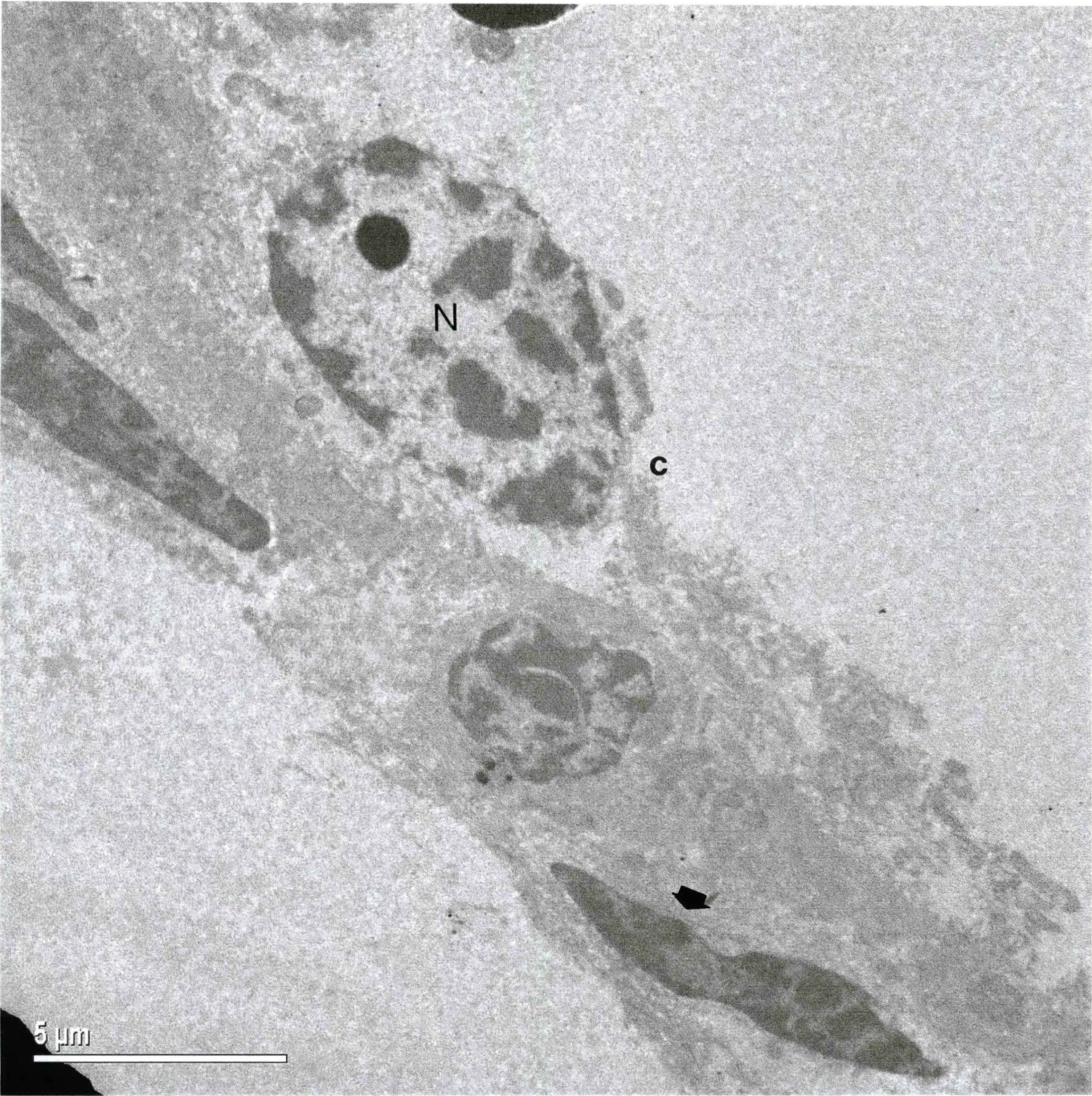


Figura 15: Corte transversal de ovário de *L. intermedia*, sem contraste. Célula no início do processo de diferenciação reconhecida por seu núcleo aumentado (N) em relação aos das células epiteliais da parede do ovário (seta). Notar que o ovócito apresenta citoplasma extravasado (c) e membrana plasmática não observável, devido ao longo período de tempo decorrido até ser realizada a fixação com glutaraldeído.





## 6. CONCLUSÕES

Para se obter uma fixação ideal do material para microscopia eletrônica de transmissão uma série de testes foi necessária, utilizando-se tampão fosfato, tampão cacodilato de sódio e NaCl. Tais combinações forneceram diferentes osmolaridades às soluções o que afeta o tempo de penetração das mesmas nos tecidos e resulta em diferentes níveis de preservação das estruturas. A presença do cacodilato de sódio e NaCl juntos foi a que forneceu as maiores possibilidades de análises, principalmente da ultraestrutura das células pedunculares do ovário.

A partir das tentativas de se observar caderinas nas junções aderentes do ovário de fêmeas jovens de *Loxosceles intermedia*, notou-se a dificuldade para conseguir uma boa preservação do material sem mudar os sítios antigênicos das glicoproteínas pelo uso do glutaraldeído. Essa dificuldade impossibilitou a observação de qualquer marcação, pois as membranas plasmáticas que eram os locais onde se esperava encontrar moléculas de caderina, romperam-se. Em experimentos futuros pode haver a possibilidade de se utilizar glutaraldeído em baixas concentrações, fixação em microondas, tampão fosfato e de se evitar a pós - fixação com o tetróxido de ósmio de modo a se obter os resultados desejados.

Como a fixação desejada ainda não foi encontrada, novas tentativas precisam ser colocadas em prática para que não somente a integridade do material seja garantida, mas também para que outros estudos como a própria imunomarcação sejam possíveis.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, R. M. G.; LOURENÇO, W. R.; TAMBOURGI, D. V. Comparison of the fertility between *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* spiders (Araneae, Sicariidae). **The journal of Arachnology**, 28, 245-247, 1999.
- FÁVARO, L. F.; CHAVES, P. de T. C. Aspectos morfológicos e citoquímicos da ovogênese de *Hypostomus* cf. *tietensis* (Loricariidae) do Lago Igapó (Londrina, PR, Brasil). **Acta Biol. Par**, Curitiba, 28, 125 – 139, 1999
- FELGENHAUER, B. E.: Araneae. In: HARRISON, F. W.; FOELIX, R. F. **Microscopic Anatomy of Invertebrates** – New York: Wiley Liss, 1999. 223 – 266.
- FISCHER, M. L. **Biologia e Ecologia de *Loxosceles intermedia* Mello – Leitão, 1934 (Araneae, Sicariidae), no Município de Curitiba, PR**. Curitiba, 1996. 137. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Zônulas de Adesão. In \_ **Tratado de Histologia** – Philadelphia: Guanabara –Koogan, 1999, 76.
- GIORGI, F.; CECCHETTINI, A.; LUCCHESI, P; MAZZINI, M. Oocyte Growth, Follicle Cell Differentiation and Vitellin Processing in the Stick Insect, *Carausius morosus* BR. (PHASMATODEA). **J. Esp. Morphol. Embryol**, 22 (2-4), 271 - 293, 1993.
- HADDAD, A.; SESSO, A; ATTIAS, M.; FARINA, M.; MEIRELLES, M. de N.; SILVEIRA, M.; BENCHIMOL, M.; SOARES, M. S.; BARTH, M.; MACHADO, R. D.; SOUTO-PADRÓN, T.; SOUZA, W. de. **Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicada às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Departamento de Editoração Eletrônica da UENF, 1998.
- HAYAT, M. A; **Principles and techniques of electron microscopy** – New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1970.
- MIYAZAKI, K; UESHIMA, R.; MAKIOKA, T. Structure of the female reproductive system and oogenetic mode in a schizomid, *Schizomus sawadai* (Arachnida, Schizomida). **Invertebrate Reproduction and Development**, 40, 1, 1 – 7, 2001.
- MORISHITA, R. **Análise Histológica e Ultraestrutural do Ovário de Aranha – Marrom, *Loxosceles intermedia***. Curitiba, 1999. 20. Relatório Semestral de Bolsa de Iniciação Científica. (Graduação em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- MORISHITA, R. **Estudo das Interações Entre Ovócitos e Células Foliculares no Ovário da Aranha – Marrom, *Loxosceles intermedia***. Curitiba, 2003. 72. Dissertação. (Mestrado em Biologia Celular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MORISHITA, R.; FERREIRA, S. A.; FILHA, A S.; FARACO, C. D. Studies on oogenesis and oviposition in the brown spider *Loxosceles intermedia* (Araneae: Sicariidae). **Anatomical Records**. 2003.

NIEWIADOMSKA, P.; GODT, D.; TEPASS, U. D-E Cadherin is Required for Intercellular Motility during *Drosophila* Oogenesis. **The journal of Cell Biology**. Canadá, 144, 3, 533-539, 1999.

OSAKI, H. Electron Microscope Studies on Developing Oocytes of the Spider, *Plexippus paykulli*. **Zoological Society of Japan**. Japão, 45, 4, 187 – 200, 1972.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. Quelicerados. In: \_\_. **Zoologia dos Invertebrados** – São Paulo: Roca, 1996. 599 – 651.

SANTIAGO FILHA, A da C. **Estudo do Destino dos Ovários Maduros de *Loxosceles intermedia* com Ênfase na Localização do Eventos de Fertilização**. Curitiba, 2002. 30. Relatório Final de Iniciação Científica. (Graduação em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SANTIAGO FILHA, A da C. **Estudo do Ovário de Fêmeas Jovens de *Loxosceles intermedia*, Mello Leitão, 1934 (Araneae: Sicariidae)**. Curitiba, 2003. 36. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SONG, X.; ZHU, C-H; DOAN, C.; XIE, T. Germline stem cells anchored by adherens junction in the *Drosophila* ovary niches. **Science**. 296, 1855 – 1857, 2002.

SOROKA, Y.; MILNER, Y.; SAGI, A. The hepatopancreas as a site of yolk protein sythesis in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Invertebrate reproduction and Development**. Philadelphia, 37, 1, 61 – 68, 2000.

SUZUKI, H. Fertilization occurs internally in the spider *Achaearanea tepidariorum* (C. Koch). **Invertebrate Reproduction and Development**. Japão, 28, 3, 211-214, 1995.

SUZUKI, S. Structural changes of the female genitalia during a reproductive cycle in the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*. **Invertebrate Reproduction and Development**. Philadelphia, 40, 1, 9-15, 2001.

VALENTE, M. M. **Estudo Anátomo – Histológico do Aparelho Reprodutor da Fêmea de *Ramphobeteus sorocabae* Mello – Leitão, 1923 (Araneae – Aviculariidae)**. Botucatu, 1984. 118. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, Universidade Estadual Paulista.

WARBURG, M. R.; ROSENBERG, M. The reproductive system of female *Buthotus judaicus* (Scorpiones; Buthidae). **Biological Structures and Morphogenesis**. 4, 1, 33 – 37, 1992.



YAP, A S.; KOVACS, E. M. Direct cadherin – activated cell signaling: a view from the plasma membrane. **The Journal of Cell Biology**. 160, 1, 1 – 13, 2002.